

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-335293

(43)Date of publication of application : 07.12.1999

(51)Int.Cl.

A61K 35/80

A61K 35/80

A61K 35/80

// A61K 7/00

A61K 7/02

A61K 7/48

A61K 9/70

(21)Application number : 10-141065

(71)Applicant : YAKULT HONSHA CO LTD

(22)Date of filing : 22.05.1998

(72)Inventor : SHIRAIISHI TATSUTOSHI
NISHIDA YUMIKO
SONE TOSHIRO
ICHIOKA MINORU
OWAKI MAKOTO

(54) CELL ACTIVATOR, PREPARATION OF CELL ACTIVATOR AND SKIN LOTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject substance having strong physiological activities such as a cell-proliferating action and a collagen production-stimulating action and useful for various kinds of skin lotion, such as medicines, quasi-medicines or cosmetics, by including an extract of chlorella with an organic solvent.

SOLUTION: This cell activator contains an extract of chlorella with an organic solvent, preferably methanol or hexane, as an active ingredient. The substance is preferably prepared by bringing the dried product of chlorella, such as *Chlorella regularis*, into contact with the organic solvent in the absence of water preferably at room temperature to 60° C for about 15-45 min to elute cell-activating substance ingredients from the dry product.

(19)日本国特許庁(J.P.)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-335293

(43)公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int. Cl. ⁸ A 61 K 35/80	識別記号 ADT ADA AED	FI A 61 K 35/80	ADTA ADAA AEDA K U
A 61 K 7/00		7/00	
審査請求 未請求 請求項の数 5 OI (全 10 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平10-141065	(71)出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(22)出願日	平成10年(1998)5月22日	(72)発明者	白石 延敏 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		(72)発明者	西田 由美子 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		(72)発明者	谷根 俊郎 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会 社ヤクルト本社内
		(74)代理人	弁理士 佐藤 正年 (外1名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞試験物質、細胞賦活物質の調製法、及び皮膚外用剤

(57)【要約】

【課題】 クロレラ抽出画分の中でも特に細胞増殖作用及びコラーゲン産生促進作用等の生体活性の強い細胞賦活物質を得る。

【解決手段】 有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とする細胞賦活物質。

【請求項2】 メタノール又はヘキサンの何れかの有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とする細胞賦活物質。

【請求項3】 有機溶媒にクロレラ乾燥体を水非存在下で接触させて、該クロレラ乾燥体の細胞賦活物質成分を該有機溶媒中に溶出させることを特徴とする細胞賦活物質の調製法。

【請求項4】 メタノール又はヘキサンの何れかの有機溶媒にクロレラ乾燥体を水非存在下で接触させて、該クロレラ乾燥体の細胞賦活物質成分を該有機溶媒中に溶出させることを特徴とする細胞賦活物質の調製法。

【請求項5】 請求項1又は2記載の細胞賦活物質を含有することを特徴とする皮膚外用剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は皮膚細胞の賦活物質、並びにこれを含む有る医薬品、医薬部外品、又は化粧品分野の各種皮膚外用剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 クロレラは、クロロコッカス目(Chlorococcales)、オオシズキ目(Oocystaceae)、クロレラ属(Chlorella)に分類される直径3〜10ミクロンの球形或いは棒形の淡水性藍藻細胞である。その細胞中には良質のタンパク質や必須アミノ酸、ビタミン類、ミネラル類がバランスよく豊富に含まれており、増殖速度が速く、生産性が高いという利点もあるため、健康食品、食品素材、及び養殖魚等の飼料素材等として好適に利用されている。

【0003】 クロレラの熱水抽出液は、可溶性タンパク質、アミノ酸、糖類等を含有する細胞増殖因子として知られている。これは、ヒト細胞へ有用な成分と考えられており、化粧品素材等として応用されている。例えば、特開昭57-206384号公報にはクロレラ熱水抽出液を0.09〜0.09%含有する化粧品が、特開昭52-125835号公報にはクロレラ抽出液と蜂蜜とを含有する皮膚化粧料が、特開昭55-062005号公報にはクロレラの水性溶媒抽出液を含有する皮膚化粧料が、それぞれ開示されている。そして、これらが皮膚へ及ぼす生理作用として、シミ、しわの除去、皮膚細胞の賦活化等が挙げられている。また、特開昭54-076834号公報には、クロレラ熱水抽出物を含有する養毛剤が開示されている。

【0004】 更に、上記のようなクロレラ水抽出物の細胞賦活作用に関し、特開昭57-206384号公報にはクロレラの水性抽出物がヒト細胞の分裂回数を伸ばす旨が、特開平9-040523号公報にはクロレラの水抽出物が線粒体増殖促進作用を有することがそれぞれ開示されている。

【0005】 以上のように、クロレラの水抽出物若しくは

は水性溶媒抽出物に関しては、細胞の賦活化等様々な有用作用が報告されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、本発明者がクロレラ抽出物の有する生理作用に関し研究したところ、クロレラの水抽出物には、1〜250μg/ml程度の低濃度では、明瞭な細胞増殖作用は見られなかった。この点に関し、特開平9-40523号公報には、およそ500μg/mlと高濃度のクロレラ抽出分を用いる線粒体細胞の増殖作用が確認されている。

【0007】 しかし、クロレラ抽出物を化粧品等に配合する場合、高濃度ではコストの増加、着色、乳化状態の悪化及び垢の析出等の問題が生じてしまう。

【0008】 従って、本発明は、クロレラ抽出成分の中でも特に細胞増殖作用等の生理活性の高い細胞賦活物質を得ることを目的とする。また、この生理活性の高い細胞賦活物質を含有する皮膚外用剤を得ることを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本請求項1に記載された発明に係る細胞賦活物質は、有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とするものである。

【0010】 本請求項2に記載された発明に係る細胞賦活物質は、メタノール又はヘキサンの何れかの有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とするものである。

【0011】 本請求項3に記載された発明に係る細胞賦活物質の調製法は、有機溶媒にクロレラ乾燥体を水非存在下で接触させて、該クロレラ乾燥体の細胞賦活物質成分を該有機溶媒中に溶出させる方法である。

【0012】 本請求項4に記載された発明に係る細胞賦活物質の調製法は、メタノール又はヘキサンの何れかの有機溶媒にクロレラ乾燥体を水非存在下で接触させて、該クロレラ乾燥体の細胞賦活物質成分を該有機溶媒中に溶出させる方法である。

【0013】 本請求項5に記載された発明に係る皮膚外用剤は、有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とするものである。

【0014】

【発明の実施の形態】 本発明においては、アルコールを始めとして極性値(Polarity Index: Godfrey, Norman B., "Solvent Selection via Miscibility Number", CHEM. CH., pp. 359-363, 1972)が6.6以下の有機溶媒を用いて抽出を行うと強いヒト線粒体細胞の増殖促進作用を有する細胞賦活成分が抽出されるが、実質的に溶媒中に水が混入されているとクロレラ中の細胞賦活成分の収率が低下することを見出し本発明を完成した。

【0015】 即ち、本発明の細胞賦活物質は、有機溶媒によるクロレラ抽出物を有効成分とするものである。これにより、細胞賦活成分を有するクロレラ抽出成分を多く含み、抽出成分の中でも特に細胞増殖作用、コラーゲ

ン産生等の促進作用等の生体活性の強い細胞賦活物質を得ることができる。

【00016】本発明の有機溶媒としては、極性値が6.6以下であるものが選択される。例えば、メタノール（極性値6.6）、アセトン（極性値5.4）、エタノール（極性値5.2）、ベンゼン（極性値3.0）、ヘキサン（極性値0.0）の何れか1つ以上の有機溶媒が選択される。

【00017】より好ましくは、メタノール（極性値6.6）又はヘキサン（極性値0.0）が選択される。有機溶媒としてのメタノールは、他の有機溶媒と比べて細胞賦活物質が圧倒的に多く抽出することができるからである。一方、有機溶媒としてのヘキサンは、他の有機溶媒と比べて細胞増殖効果が高いからである。

【00018】また、抽出に使用するクロレラの種は特に限定される。クロレラ・ブルガリス（*Chlorella vulgaris*）、クロレラ・ピレンノイドサ（*Chlorella pyrenoidosa*）、クロレラ・レギュラリス（*Chlorella regularis*）、クロレラ・エリプソイデア（*Chlorella ellipsoidea*）などいずれも好適に使用可能である。中でも増殖性及び対数収率の面から、クロレラ・レギュラリス（*Chlorella regularis*）が好ましい。

【00019】本発明の細胞賦活物質の調製は、前記有機溶媒によってクロレラ乾燥体を水相存在下で接触させて、該クロレラ乾燥体の細胞賦活物質成分を該有機溶媒中に抽出させて得られる。

【00020】具体的には、クロレラ乾燥体を前記有機溶媒（例えばアルコール）に接触させ、抽出を行う。この場合、クロレラ乾燥体の水分によってクロレラ中の有効成分の抽出効率が低下するため、完全に乾燥させる。

【00021】抽出は、クロレラに溶媒を添加した後、常温あるいは加熱した状態で行えばよい。このとき、抽出温度や時間等の条件は特に限定されるものではないが、抽出の作業性等を考慮すると、温度は室温から60℃程度までの範囲内、抽出時間は15～45分程度の範囲内とするのが好ましい。

【00022】こうして得られる抽出物は、そのままでも強い細胞賦活作用を有しているものの、遠心分離、限外濾過等の手段によって上清成分を回収することにより、更に活性の強いものが得られる。このような抽出方法の1例として、例えば、乾燥したクロレラ粉末にメタノールを接触させ、50～60℃で15分間経過する方法が挙げられる。これにより得られる抽出物の上清成分は、強い細胞増殖促進作用ばかりでなくコラーゲン産生促進作用を有している。

【00023】上記のようにして得られるクロレラ抽出物は、使用する溶媒の種類によっては抽出物もしくはその上清成分をそのまま使用できる。しかしながら、メタノール等のように溶媒自体に細胞毒性がある場合には、これをそのまま皮膚外用剤等へ配合するよりも他の配合成分と混合することにより充分に希釈するか、吸着乾燥或

いは加熱乾燥等適宜の手段で溶媒を取り除いてから使用することが好ましい。

【00024】また、本発明のクロレラ抽出物あるいはその上清成分は、上記のような溶媒の種類に応じた処理の必要性にかかわらず、使用目的に応じて乾燥、濃縮あるいは希釈などの操作を行い使用してもよい。必要なら、その効力に影響のない範囲で脱臭、脱色などの精製処理を、通常使用される手段を用いて行ってもよい。

【00025】本発明のクロレラ抽出物を皮膚外用剤等に配合する場合、その配合量は特に規定されるものではなく、クロレラ重量に対して好ましくは0.01%～80%、特にコスト面等の理由からは0.1%～50%とすることが好ましい。配合量の細かい設定は、細胞賦活物質、医薬品、医薬部外品あるいは化粧品等、用途やその種類、品質、期待される作用の程度等を考慮し、適宜決定すればよい。

【00026】本発明においては、上記クロレラ抽出物がヒト皮膚由来繊維芽細胞の増殖促進作用及びコラーゲン産生促進作用を有すること。また、クロレラを水性溶媒（水あるいは酸、塩基、塩もしくは有機溶媒が溶解された水溶液等）で抽出すると細胞賦活成分がほとんど抽出されないことが見出された。しかし、このような知見は従来の報告、すなわちクロレラの熱水抽出物に細胞賦活作用がある等の報告と相違するものである。上記報告例の中には熱水抽出物をゲル濾過等の手段で精製しているものもあるため、このような処理によって抽出物中の細胞賦活物質を阻害する物質が除去されている可能性もあり、また、クロレラ抽出物の濃度を高めることで細胞賦活作用が現れる可能性もあるが、これは定かではない。

【00027】しかしながら、本発明では極地中に動物血漿が存在するか否かにかかわらず、クロレラ抽出物が繊維芽細胞の増殖を促進することなど、その細胞賦活作用は充分に確がめられており、このことから、クロレラを極性の低い溶媒で抽出することにより、細胞賦活作用を有する抽出物が効率よく得られることは明らかである。これは、クロレラ成分の中でも比較的極性の溶媒に親和性が高いと思われる物質に細胞賦活作用があることを示唆していると考えられる。

【00028】本発明のクロレラ抽出物は、上記のように医薬品、医薬部外品、化粧品等様々な用途に使用可能である。その際、各種賦形剤、水、アルコール類、油類、界面活性剤、防腐剤、香料、色素等これらに通常使用されている成分と併用しても何ら問題はない。また、他の細胞賦活物質を配合することによって、よりいっそうの賦活効果が期待できる。

【00029】

【実施例】 以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。本発明はこれらに限定されるものではない。

【00030】製造例1 クロレラの培養
クロレラ（*Chlorella regularis* S-88）を、炭素源とし

でグルコースを用い、無酸素存在下で36℃で25~26時間培養した。培養後、水洗して凍結乾燥した。

【0031】製造例2: グロレラの有機溶媒抽出

製造例1で得られたクロレラ乾燥末10gに100mlのメタノールを加え、50℃で15分間振盪抽出した。抽出液を遠心分離後、残渣に100mlのメタノールを加え、同条件で再度振盪抽出した。この操作を2回繰り返した後、全ての抽出上清を回収し、50℃で減圧乾燥して、抽出成分780mgを得た。この抽出成分にジメチルスルホキシド(DMSO)適量を添加して十分混和した後、孔径:0.2μmのフィルターにて濾過滅菌した。

【0032】高、有機溶媒をアセトン、エタノール、ベンゼン、ヘキサンとして、同様の操作によって、各有機溶媒の抽出成分を得た。次の表1に各溶媒による固形物量を比較した結果を示す。表1に示すとおり、メタノールによる抽出は他の溶媒と比較して圧倒的に多いことが判る。

【0033】

【表1】

抽出溶媒	固形物量	固形物収量
ヘキサン	0.0	27.0mg
ベンゼン	0.0	39.0mg
エタノール	5.2	76.0mg
アセトン	5.4	46.0mg
メタノール	6.6	786.0mg

【0034】

添加濃度(μg/ml)	吸光度(590-660nm)	添加濃度(μg/ml)	吸光度(590-660nm)
0	0.118	18.00	0.110
0.25	0.109	25.00	0.121
1.25	0.114	130.00	0.203
2.50	0.111	250.00	0.212

【表3】

添加濃度(μg/ml)	吸光度(590-660nm)	添加濃度(μg/ml)	吸光度(590-660nm)
0	0.132	25.75	0.109
1.43	0.153	143.75	0.119
14.31	0.139	257.50	0.089

【0035】表2は、製造例2で得られたクロレラ熱メタノール抽出成分の細胞増殖促進効果を示し、図1は、表2をグラフ化した棒グラフである。図において、**はコントロールに対して有意($p < 0.01$; $n = 6$)を示す。表3は、製造例3で得られたクロレラ熱水抽出成分の細胞増殖への影響を示し、図2は、表3をグラフ化した棒グラフである。

【0040】表2及び図1より、製造例2で得られたクロレラ熱メタノール抽出成分は、腸癌芽細胞の増殖を促進することが示され、濃度が260.00 μg/mlでコントロールに比較して約90%の増殖促進が認められた。一方、

【0039】製造例3: クロレラの水抽出

製造例1で得られたクロレラ乾燥末10gに水100mlを加え、80℃で2時間振盪抽出した。抽出液を遠心分離し、凍結乾燥して抽出成分1.07gを得た。この抽出成分に水75mlを添加して十分混和した後、孔径:0.2μmのフィルターにて濾過滅菌した。

【0039】試験例1: 細胞増殖試験

10% FCS (牛胎児血清)含有R1TC80-7増地(商品名: 橋本製薬工業(株)より市販)を用い、ヒト皮膚由来正常繊維芽細胞(CCD45SK; 大日本製薬(株)より市販)を、 1×10^4 cells/wellの密度で96 wells plateに分注し、24時間、37℃、5% CO₂存在下にて培養した。その後増地を、所定の濃度にて試験物質を添加した10% FCS含有R1TC80-7増地に交換し、9日間、37℃、5% CO₂存在下にて培養した。

【0036】培養後、増地を取り除き、0.4%クリスタルバイオレットメタノール溶液を加えて30分間室温で静置した後水洗し、増殖した繊維芽細胞数を乾燥後、590 nmの吸収度の比較によって求めた。尚、試験物質の濃度のみを添加した10% FCS含有R1TC80-7増地をコントロールとして比較検討した。得られた結果を以下の表2と表3、及び図1と図2に示す。

【0037】

【表2】

表3及び図2より、製造例3で得られたクロレラ熱水抽出成分は細胞増殖には、ほとんど影響しないことがわかった。

【0041】試験例2: 無血清培養試験

10% FCS含有R1TC80-7増地を用い、ヒト皮膚由来正常繊維芽細胞(CCD45SK)を 1×10^4 cells/wellの密度で96 wells plateに分注し、24時間、37℃、5% CO₂存在下にて培養した。その後、試験物質を添加した無血清増地に増地を交換し、9日間、37℃、5% CO₂存在下にて培養した。培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、コールターカウンターにて細胞数を求

めた、無血清培地としては5%の牛血清アルブミン、0.01mg/LのEGF、1mg/Lのインジュリンおよび1mg/Lのハイドロコージンを添加したRITC80-7培地を用いた。前、被験物質の溶液のみを添加した無血清培地をコントロールとして比較検討した。結果を図3に示す。

【0042】図3は、無血清培地におけるクロレラ熱メタノール抽出成分の細胞の増殖促進効果を示す棒グラフである。図3に示す通り、製造例2で得られたクロレラ熱メタノール抽出成分は、無血清下でも株維持細胞の増殖を促進することが示され、130.0 μg/mlの濃度でコントロールに比較して約50%の増殖の促進が認められた。

【0043】試験例3 コラーゲン産生試験

1.0% FCS含有RITC80-7培地を用い、ヒト皮膚由来正常線維芽細胞(CCD45SK)を1×10⁴ cells/wellの密度で96 wells plateに分注し、24時間、37℃、5%CO₂存在下に培養した。その後、被験物質を添加した無血清培地に培地を交換し、5日間、37℃、5%CO₂存在下に培養した。無血清培地としては、5%の牛血清アルブミン、0.01mg/LのEGF、1mg/Lのインジュリンおよび1mg/Lのハイドロコージンを添加したRITC80-7培地を用いた。培養後、培地を回収し、Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit (商品名：宝通薬株式会社より市販)を用いて培地中のP-IP量を測定した。前、被験物質の溶液のみを添加した無血清培地をコントロールとして比較検討した。結果を図4に示す。

【0044】図4は、クロレラ熱メタノール抽出成分の

細胞由来Procollagen type I産生促進効果を示す棒グラフである。図示の通り、クロレラ熱メタノール抽出成分はコントロールに対して細胞あたりのP-IP産生量を促進することが確認でき、例えば130.0 μg/mlの濃度でコントロールに比較して約90%の産生促進が認められた。

【0045】試験例4 骨有機溶媒抽出成分による細胞増殖促進効果とコラーゲン産生促進効果

試験例3と同様に、10% FCS含有RITC80-7培地を用い、ヒト皮膚由来正常線維芽細胞(CCD45SK)を1×10⁴ cells/wellの密度で96 wells plateに分注し、24時間、37℃、5%CO₂存在下に培養した。その後培地を、各有機溶媒からの被験物質を添加した無血清培地に交換し、5日間、37℃、5%CO₂存在下に培養した。培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、コールターカウンターにて細胞数を求めた。無血清培地としては5%の牛血清アルブミン、0.01mg/LのEGF、1mg/Lのインジュリンおよび1mg/Lのハイドロコージンを添加したRITC80-7培地を用いた。前、被験物質の溶液のみを添加した無血清培地をコントロールとして比較検討した。結果を次の表4及び図5に示す。

【0046】培養後、培地を回収し、Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit (宝通薬株式会社より市販)を用いて培地中のP-IP量を測定した。なお、被験物質の溶液のみを添加した無血清培地をコントロールとして比較検討した。結果を表4及び図6に示す。

【0047】

【表4】

抽出成分	添加濃度(μg/ml)	細胞数(cells/well)	細胞あたりのP-IP量(ng/well)
ヘキサシン	27.00	50332	0.524
	5.00	50158	0.495
	0	40769	0.299
ベンゼン	39.00	46621	0.609
	9.75	38103	0.336
	0	40764	0.299
エタノール	33.30	49171	0.522
	15.15	45452	0.282
	0	40796	0.299
アセトン	24.40	44522	0.519
	12.20	41650	0.137
	0	40766	0.299
メタノール	150.00	57302	0.475
	26.00	45308	0.516
	0	40768	0.299

【0048】図5は、各有機溶媒抽出成分による細胞増殖促進効果を示す折れ線グラフであり、図6は、各有機溶媒抽出成分によるProcollagen type I産生効果を示す

折れ線グラフである。図5に示す通り、抽出成分の添加濃度に応じて細胞数が増加していることが判る。特に、ヘキサシンによる抽出成分では細胞増殖促進効果が優れて

いることが判る。また、図5に示す通り、各有機溶媒抽出画分の全てにコラーゲン産生効果が確認された。

【0049】以下の各実施例について常法に従い、各々

- (1) クロレラ熱メタノール抽出画分
- (2) ステアリン酸
- (3) グリセリンモノステアレート
- (4) セタノール
- (5) ミリスチン酸イソプロピル
- (6) 流動パラフィン
- (7) ミツロウ
- (8) ブチルパラベン
- (9) 1,3-ブチレングリコール
- (10) トリエタノールアミン
- (11) キサンタンガム
- (12) メチルパラベン
- (13) タルク
- (14) カオリン
- (15) 顔料
- (16) 香料
- (17) 精製水

【0050】実施例2

- (1) クロレラ熱メタノール抽出画分
- (2) セリサイト
- (3) 炭酸マグネシウム
- (4) トリイソオクタノール酸グリセリン
- (5) 酸化チタン
- (6) スクワラン
- (7) メチルパラベン
- (8) タルク
- (9) カオリン
- (10) 顔料
- (11) 香料

【0051】実施例3

- (1) クロレラ熱メタノール抽出画分
- (2) 流動パラフィン
- (3) セレシン
- (4) 牛脂
- (5) セタノール
- (6) ステアリン酸
- (7) 自己乳化型モノステアリン酸グリセリン
- (8) ポリオキシエチレン (6)
- セチルエーテル
- (9) ポリオキシエチレン (20)
- セチルエーテル
- (10) ブチルパラベン
- (11) プロピレングリコール
- (12) トリエタノールアミン
- (13) メチルパラベン
- (14) 酸化チタン
- (15) カオリン

の組成に示す外用剤を併製した。

実施例1

下記組成のメークアップベースを製造した。

7. 0 (重量%)
3. 0
3. 0
1. 5
5. 0
4. 0
5. 0
0. 2
3. 0
1. 5
0. 2
0. 2
5. 0
4. 0
- 適量
- 適量

全体で100となる量

下記組成のフェイスパウダーを製造した。

5. 0 (重量%)
15. 0
5. 0
2. 0
5. 0
3. 0
2. 0
50. 0
10. 0
- 適量
- 適量

下記組成の乳化型ファンデーションを製造した。

5. 0 (重量%)
12. 0
1. 0
2. 0
1. 0
3. 0
2. 0
1. 0
0. 15
3. 0
0. 5
0. 15
8. 0
8. 0

	(16) 無水ケイ酸	0.5
	(17) 顔料	適量
	(18) 香料	適量
	(19) 精製水	全体で100となる量
【0052】実施例4		下記組成のバックを製造した。
	(1) クロレラ熱メタノール抽出画分	2.0 (重量%)
	(2) エタノール	12.0
	(3) 1,3ブチレンジグリコール	4.0
	(4) 酸化チタン	4.0
	(5) ポリビニルアルコール	14.0
	(6) メチルパラベン	0.2
	(7) 顔料	適量
	(8) 精製水	全体で100となる量
【0053】実施例5		下記組成のペースト状バックを製造した。
	(1) クロレラ熱メタノール抽出画分	5.0 (重量%)
	(2) エタノール	12.0
	(3) 1,3ブチレンジグリコール	4.0
	(4) ポリオキシエチレン (30)	
	ポリオキシプロピレン (35)	1.0
	(5) ポリビニルアルコール	14.0
	(6) メチルパラベン	0.2
	(7) 顔料	適量
【0054】実施例6	(8) 香料	適量
	(9) 精製水	全体で100となる量
		下記組成のバック剤を製造した。
	(1) クロレラ熱メタノール抽出画分	0.5 (重量%)
	(2) カオリン細末 (減量)	52.7
	(3) 水酸化カリウム	適量
	(4) グリセリン	42.5
	(5) チモール	0.05
	(6) サリチル酸メチル	0.2
	(7) ハッカ油	0.05
【0055】実施例7		下記組成の化粧水を製造した。
	(1) クロレラ熱メタノール抽出画分	0.5 (重量%)
	(2) エタノール	5.0
	(3) 1,3ブチレンジグリコール	2.0
	(4) ヒアルロン酸	0.2
	(5) ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.05
	(6) パラオキシ安息香酸メチル	0.1
	(7) 香料	0.1
	(8) 精製水	全体で100となる量
【0056】実施例8		下記組成の乳液を製造した。
	(1) クロレラ熱メタノール抽出画分	1.0 (重量%)
	(2) ステアリン酸	2.0
	(3) 流動パラフィン	5.0
	(4) スクワラン	2.0
	(5) ソルビタンモノステアレート	1.5
	(6) ポリオキシエチレン (20)	
	ソルビタンモノステアレート	2.0
	(7) パラオキシ安息香酸ブチル	0.05

- (8) グリセリン 2.0
 (9) パラオキシ安息香酸メチル 0.1
 (10) 香料 0.15
 (11) 精製水 全体で100となる量

【0057】実施例9

- (1) クロレラ株メタノール抽出成分 2.0 (重量%)
 (2) 潤滑パラフィン 20.0
 (3) ウセリン 7.0
 (4) セタノール 1.0
 (5) ステアリン酸 2.0
 (6) ミツロウ 2.0
 (7) ソルビタンモノステアレート 3.5
 (8) ポリオキシエチレン(20) 2.5
 (9) ソルビタンモノステアレート 0.05
 (10) ビアロン酸 0.1
 (11) 1,3ブチレングリコール 1.0
 (12) パラオキシ安息香酸メチル 0.1
 (13) 乳酸菌培養液 5.0
 (14) 香料 0.15
 (15) 精製水 全体で100となる量

【0058】本発明のクロレラ抽出成分は細胞の増殖促進効果に優れ、また細胞のコラーゲン産生の促進効果に優れており、これを配合すれば優れた細胞賦活効果を有する皮膚外用剤が得られる。

【0059】比較例1

実施例4のクロレラ株メタノール抽出成分を同量のクロレラ株水抽出成分に置き換え、バック剤を製造した。

【0060】<使用試験>被験者16名をパネラーとして9名ずつ2群に分け、実施例4及び比較例のバック剤を使用させた。詳しくは各々のバック剤を顔面顔に塗布し、乾燥後制してその使用感を比較した。尚、使用感

下記組成のクリームを製造した。

2.0 (重量%)

20.0

7.0

1.0

2.0

2.0

3.5

2.5

0.05

0.1

1.0

0.1

5.0

0.15

全体で100となる量

の判定基準は、良い+2、やや良い+1、普通0、やや悪い-1、悪い-2とした。結果を次の表5、表6、表7に示す。表5は実施例4を塗布した群（パネラー1～8）、表6は比較例を塗布した群（パネラー9～16）、表7は表5及び表6の平均値を示す。各々の表に示すとおり、実施例4に示したバック剤の方が、伸び、バック剤の剥がし易さ等で高得点が得られ、総合評価も高かった。

【0061】

【表5】

（実施例4塗布群）

パネラー	1	2	3	4	5	6	7	8
固さ	+1	0	0	0	+1	+1	0	+1
伸び	+1	+1	+2	+1	0	+1	+1	+1
肌へのなじみ	+1	0	+2	0	+1	+1	0	+1
使用後のべとつき感	0	+2	+1	0	+1	0	+1	+1
使用後のさっぱり感	+2	0	+1	+1	3	0	+1	0
バック剤の剥がし易さ	+1	+1	+1	+2	0	+1	0	0
使用感総合	+2	+1	+1	+1	0	+2	+1	+1

【0062】

【表6】

【比較例抽出液】

パネラー	9	10	11	12	13	14	15	16
長さ	0	-1	0	0	0	+1	0	0
伸び	0	0	0	-1	0	0	-1	0
肌へのなじみ	+1	+1	0	0	+1	-1	0	+1
使用後のべとつき感	0	0	0	0	0	0	0	+1
使用後のさっぱり感	0	0	+1	0	+1	-1	0	-1
パック剤のぬかし易さ	0	0	0	+1	0	+1	0	0
使用感総合	0	0	0	0	+1	0	0	+1

【0063】

【表7】

【従属値平均値】

パネラー	実施例4抽出液	比較例抽出液
長さ	0.5	0
伸び	1.0	-0.25
肌へのなじみ	0.75	0.38
使用後のべとつき感	0.75	0.13
使用後のさっぱり感	0.68	0
パック剤のぬかし易さ	0.75	0.25
使用感総合	1.18	0.25

【0064】

【発明の効果】本発明は以上説明した通り、クロレラ抽出成分の中でも特に細胞増殖作用及びコラーゲン産生促進作用等の生理活性の強い細胞賦活物質を得ることができる。また、この生理活性の強い細胞賦活物質を含有する皮膚外用剤を得ることができるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】クロレラ熱メタノール抽出成分の細胞増殖促進効果を示す棒グラフである。

【図2】クロレラ熱水抽出成分の細胞増殖抑制効果を示

す棒グラフである。

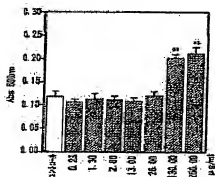
【図3】無血清培地におけるクロレラ熱メタノール抽出成分の細胞の増殖促進効果を示す棒グラフである。

【図4】クロレラ熱メタノール抽出成分の細胞由来Procollagen type I 産生促進効果を示す棒グラフである。

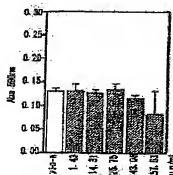
【図5】各有機溶媒抽出成分による細胞増殖促進効果を示す折れ線グラフである。

【図6】各有機溶媒抽出成分によるProcollagen type I 産生促進効果を示す折れ線グラフである。

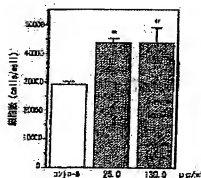
【図1】



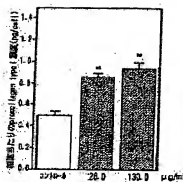
【図2】



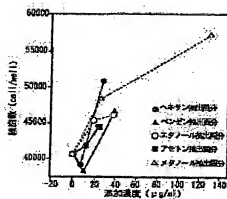
【図3】



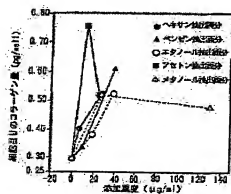
〔図4〕



〔図5〕



〔図6〕



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 6

A 61 K

7/00

7/02

7/48

9/70

識別記号

3 4 1

F. I

A 61 K

7/00

7/02

7/48

9/70

W

P

3 4 1

(72)発明者 市岡 修

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

(72)発明者 大崎 真

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内